

Análisis de la morfocinética de las primeras divisiones embrionarias y su relación con la viabilidad del embrión

Trabajo Fin de Grado Biotecnología

Autora: Jessica Comín Polo

Director: Antonio Urrís López



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Curso 2015-2016

Antonio Urríes López, Director de Reproducción Asistida QuirónSalud Zaragoza

INFORMA:

Que la alumna Jessica Comín Polo ha realizado bajo mi dirección, en el Hospital QuirónSalud de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado “Análisis de la morfocinética de las primeras divisiones embrionarias y su relación con la viabilidad del embrión”. Este trabajo cumple con los objetivos recogidos en las Directrices TFG de Biotecnología, por lo que considero procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Zaragoza a 17 de junio de 2016.



Antonio Urríes López



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
Reabsorción.....	9
Fragmentación.....	9
Tipo de división	9
Recuento espermático	9
Tasa de embarazo.....	10
Afectación de la reabsorción según el tipo de división embrionaria	10
Afectación de la reabsorción según el recuento espermático	11
Afectación de la fragmentación según el tipo de división embrionaria.....	12
Afectación de la fragmentación según el recuento espermático	13
Afectación del tipo de división según el recuento espermático	13
Afectación del tiempo entre desaparición de PN y primera división según el tipo de división, la reabsorción y la fragmentación	14
Afectación del tiempo entre desaparición de PN y primera división según el recuento espermático	17
Afectación de la tasa de embarazo según la reabsorción	18
Afectación de la tasa de embarazo según el tipo de división embrionaria	18
Afectación de la tasa de embarazo según la fragmentación	19
Afectación de la tasa de embarazo según el tiempo entre desaparición de PN y primera división.....	21
CONCLUSIONES.....	22
CONCLUSIONS	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

RESUMEN

La tecnología *time-lapse*, acompañada del análisis morfocinético del embrión, está revolucionando el campo de la reproducción asistida, ya que permite, mediante la toma de imágenes del embrión y la medida de distintos tiempos de división, predecir la capacidad de implantación de dicho embrión. La tecnología *time-lapse* utilizada en el presente trabajo se denomina Eeva (Early Embryo Viability Assessment), que cuenta con su propio sistema de clasificación embrionaria de acuerdo al análisis morfocinético del embrión: *High* (los de mayor probabilidad de implantación), *Medium* y *Low* (los de menor probabilidad de implantación).

En el presente trabajo se analizaron 663 vídeos de embriones obtenidos por la tecnología *time-lapse* y se estudiaron 4 parámetros, en concreto durante la primera división embrionaria: reabsorción, fragmentación, tipo de división (normal, anormal o caótica), y tiempo entre la desaparición de los pronúcleos (PN) y la primera división. Todos los parámetros se relacionaron entre sí, con el recuento espermático, y con la tasa de embarazo, con el objetivo de determinar cuál de ellos era el más influyente y si podría usarse como marcador para seleccionar los embriones de mejor probabilidad de implantación.

Los resultados concluyeron que la reabsorción, la fragmentación y el tiempo entre desaparición de PN y primera división aumentaban cuando se producían alteraciones en la división. Además, se observó que el factor masculino severo (recuento espermático inferior o igual a 1 millón/ml) aumentaba la reabsorción, pero no la fragmentación ni las alteraciones durante la división.

Finalmente, ni la reabsorción, ni la fragmentación, ni un mayor tiempo entre desaparición de PN y primera división redujeron de forma significativa la tasa de embarazo, pero sí las alteraciones en la división, siendo el parámetro más influyente, y el que podría usarse como marcador de selección embrionaria.

ABSTRACT

Time-lapse technology, together with the morphokinetics analysis of the embryo, is revolutionizing Assisted Reproduction field, because it allows capturing photographs of the embryos at different times of division and predicting their implantation ability. The time-lapse technology used in this project is called Eeva (Early Embryo Viability Assessment), which has its own embryonic classification system, according to the morphokinetics analysis of the embryo: High (embryos with the best implantation probability), Medium and Low (embryos with the worst implantation probability).

In this project, 663 videos obtained by time lapse-technology were analysed, and four parameters were studied during the first embryonic division: reabsorption, fragmentation, type of division (normal, abnormal and chaotic) and time between the disappearance of pronuclei (PN) and first division. All the parameters were related to each other, to the sperm concentration and to the pregnancy rate, in order to determine which of them was the most influential and if it could be used as a marker to select the embryos with the best implantation probability.

The results revealed that reabsorption, fragmentation and time between disappearance of PN and first division increased when there are alterations in the division of the embryo. Besides, it was shown that severe male factor (sperm concentration less or equal to 1 mill/ml) increased reabsorption, but not fragmentation or alterations in the division.

Finally, pregnancy rate did not decrease when there was reabsorption, fragmentation or when the time between disappearance of PN and first division was longer. However, pregnancy rate decreased when there were alterations in the division, being the type of division the most influential parameter, hence it could be used as a marker for the embryo selection.

ANTECEDENTES

Las técnicas de reproducción asistida han evolucionado mucho en los últimos años. Actualmente, en la mayoría de laboratorios se puede encontrar tecnología *time-lapse*, la cual permite obtener vídeos de los embriones que están en la incubadora. La incorporación del análisis morfocinético (estudio de parámetros relacionados con las divisiones embrionarias, sobre todo, tiempos de división) del embrión a esta nueva tecnología permite seguir su evolución completa hasta que dichos embriones sean transferidos a la mujer, y facilitar así la selección embrionaria.

La selección embrionaria clásica se basa en el análisis morfológico del embrión utilizando un microscopio. Algunos de los parámetros embrionarios que se analizan, y que se siguen analizando aunque ahora se disponga de la tecnología *time-lapse*, son: número, apariencia y localización de los corpúsculos polares, número y apariencia de los pronúcleos (PN), presencia de halo citoplasmático, número de células y ritmo de división, presencia de fragmentación, tamaño de los blastómeros (células que componen el embrión), anomalías citoplasmáticas (como vacuolas), estado de la zona pelúcida o grado de compactación^[1].

Este sistema permite clasificar los embriones en cuatro categorías: A, B, C y D, en la que los embriones A serían los de mejor probabilidad de implantación y los D los de peor. Un embrión, conforme avanzan los días en el desarrollo, puede mantenerse en la misma categoría o disminuir de categoría, pero nunca puede aumentar de categoría, es decir, un embrión clasificado como B nunca puede pasar a ser A, mientras que un A sí puede pasar a B (Figura 1). Las nuevas tecnologías, como el *time-lapse* acompañado del análisis morfocinético, están aportando nueva información y seguramente modificarán algunos de los criterios.

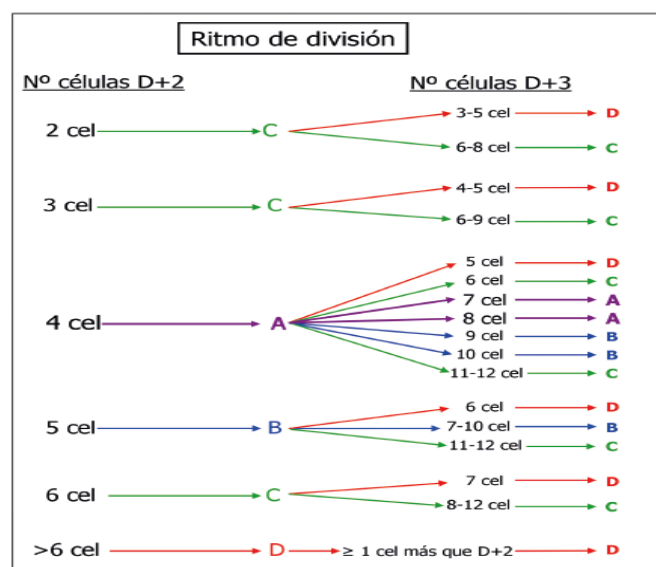


Figura 1. Tabla de clasificación embrionaria según el ritmo de división. *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 2015, 3ª Edición.*

Se han llevado a cabo numerosos experimentos para estudiar el desarrollo embrionario en sus primeros estadios utilizando la tecnología *time-lapse*, la mayoría centrados en determinar los parámetros que permiten predecir si el cigoto va a llegar a estado de blastocisto, ya que las evidencias sugieren que una formación de blastocisto más lenta se asocia con una peor calidad embrionaria^[2]. Algunos de ellos han combinado el *time-lapse* con transcriptómica (análisis de mRNA totales en una célula), determinando que el éxito o fracaso para alcanzar el estado de blastocisto está determinado antes de la activación del genoma embrionario^[3,4,5,6].

Otros estudios han utilizado la tecnología *time-lapse* para determinar la ploidía (número de juegos completos de cromosomas en una célula) del embrión a partir del comportamiento de los blastómeros^[7], y también combinándola con PCR^[4]. Basile et al. utilizaron el *time-lapse* para evaluar si el tipo de medio de cultivo de los embriones afectaba a su calidad, comprobando que ambos medios comparados producían resultados similares, sin que ninguno empeorase la misma^[8]. Dominguez et al. combinaron el *time-lapse* con el análisis proteómico (análisis de todas las proteínas de una célula) del embrión, con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores del desarrollo embrionario, así como para comprender mejor la función celular de proteínas específicas durante determinados estados del desarrollo embrionario^[9].

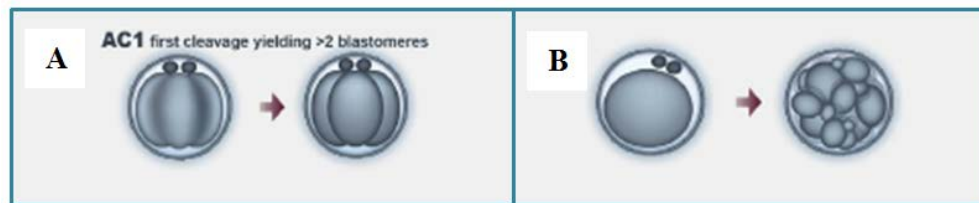
La selección embrionaria se puede mejorar de dos formas: identificando los embriones que tienen mejor desarrollo y por tanto, cabe esperar que mejor implantación; o bien haciendo selección negativa sobre aquellos que presentan un desarrollo anormal, y cuya capacidad de implantación se haya visto disminuida^[10]. Gracias a la tecnología *time-lapse* acompañada del análisis morfocinético, se puede seguir este desarrollo, y desechar aquellos embriones que hayan sufrido alteraciones^[11].

La tecnología *time-lapse* usada en este trabajo utiliza sus propios parámetros morfocinéticos internos para clasificar los embriones en tres categorías: *High* (los embriones que son potencialmente los que mejor tasa de implantación van a presentar), *Medium* (los que tendrán una tasa de implantación media) y *Low* (los que presentarían potencialmente una tasa de implantación baja). Vermilyea et al. determinaron que pacientes a las que se les transfería al menos un embrión *High* aumentaban significativamente las tasas de embarazo en comparación con pacientes a las que se les transfería un embrión clasificado como *Low*^[12].

En el presente trabajo, se analizaron los acontecimientos que tienen lugar durante la primera división embrionaria, cuando el embrión pasa de una célula a dos. Wong et al. determinaron, como ya se ha citado, que el éxito o el fracaso en el desarrollo del embrión está ya predeterminado antes de la activación de su genoma (en el día tres del desarrollo)^[3], de ahí el interés en analizar esta primera división, que tiene lugar entre las 24 – 27 horas después de la fecundación. El *time-lapse* no recoge ningún dato durante esta primera división. Sin embargo, se ha observado que alteraciones en este momento pueden comprometer la calidad del embrión.

Dos de las alteraciones más importantes, y que se han estudiado en el trabajo, son la división anormal y la división caótica. Se define división anormal (Figura 2A) como aquella división celular en la que una única célula da lugar a tres células hijas, sin que el embrión pase por estadio de dos células. La división caótica (Figura 2B) se define como una división

desordenada y errática durante las dos primeras divisiones embrionarias, en la que aparece fragmentación y, en la mayoría de las ocasiones, no es posible contar el número de células que tiene el embrión^[10]. Además, Vera-Rodriguez et all. demostraron que la mayoría de las divisiones anormales tienen lugar durante la primera división mitótica, resaltando la importancia de esta primera división^[4].



*Figura 2. A: Esquema de una división anormal. A partir de una única célula se producen tres células hijas. B: Esquema de una división caótica. Durante la división, la célula se fragmenta mucho y ya no se puede distinguir el número de células que conforman el embrión. Athayde et all., 2014, **Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development, Fertility and Sterility, vol 101, 1637-1648.***

Otro parámetro importante es la fragmentación. Wong et all. encontraron que la fragmentación, definida como la formación de fragmentos citoplasmáticos de distintos tamaños rodeados de membrana plasmática y que pueden contener DNA del núcleo o no, en embriones anormales no solía revertir, mientras que una moderada fragmentación en embriones normales de dos células a veces revertía antes de la segunda división mitótica^[3].

La generación de fragmentos citoplasmáticos se da frecuentemente entre los embriones humanos, y se cree que no solo se da in vitro, sino que también ocurre in vivo, y que la presencia de fragmentación correlaciona de forma negativa con la implantación. Además se ha observado que una gran proporción de embriones aneuploides (cambio en el número de cromosomas) y triploides (presencia de una dotación cromosómica $3n$, en vez de la normal diploide $2n$) presentan fragmentación, así como embriones que presentan errores meióticos y/o mitóticos. Al analizar estos embriones se encontró que algunos de los fragmentos portaban DNA del núcleo. También se determinó que los embriones que sufrían alteraciones en la meiosis o que parecían triploides presentaban fragmentación en el estadio de una célula, antes de la primera mitosis^[7].

Algunos autores mencionan por encima que debería tenerse en cuenta la contribución del espermatozoide en la formación del embrión^[3,4,10], puesto que es el centriolo del espermatozoide el que constituye el huso mitótico para todas las divisiones, y el que es heredado por el embrión, ya que el ovocito maduro no tiene centrosomas funcionales asociados al uso meiótico, detenido en metafase II^[13]. Chavez et all. comentan la posible relación entre la aneuploidía y la contribución paterna del centrosoma^[7]. Debido a esto, en el presente trabajo se ha querido analizar el factor masculino severo, definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una concentración de espermatozoides en el

eyaculado inferior o igual a 1 millón/ml. La OMS define como normalidad sémenes que tiene como mínimo una concentración espermática de 15 millones/ml^[14].

Relacionada con la fragmentación se encuentra la reabsorción: si un fragmento que contiene un cromosoma o parte de él es reabsorbido por la célula que lo ha originado, es probable que se restaure la euploidía (alteración en el número de juegos completos de cromosomas). Pero si es reabsorbido por una célula vecina, dará lugar a genotipos complejos que disminuirán, potencialmente, la calidad del embrión^[7], de ahí la importancia de estudiar este parámetro, sobre todo en la primera división embrionaria, ya que da lugar a las dos células a partir de las cuales se van a originar todas las demás.

Con respecto al tiempo entre la desaparición de los PN (núcleo del óvulo y del espermatozoide antes de que se unan y comience la primera división mitótica) y primera división, se trata de un parámetro que determina el tiempo que pasa desde que desaparecen los PN (fenómeno conocido como singamia, unión de los PN para dar un único núcleo) hasta la primera división mitótica del embrión. Este parámetro se ha descrito recientemente y ha sido ligado a la viabilidad del embrión, por lo que también ha sido analizado en el presente trabajo. Vero-Rodriguez et al demostraron que este tiempo es mayor en los embriones aneuploides, los cuales también presentaban mayor cantidad de divisiones anormales, en comparación con los embriones euploides^[4].

Por tanto, la tecnología *time-lapse* se considera hoy en día una herramienta de asesoramiento para la embriología clínica^[15], que además es no invasiva y objetiva^[16]. Aun así, todavía se trata de una tecnología relativamente reciente, y hay autores que creen que se ha extendido demasiado rápido y que aún deberían analizarse más datos para determinar si realmente es tan efectiva como se piensa, y si no produce ningún daño adicional sobre los embriones cultivados *in vitro*^[16, 17]. Sin embargo, su potencial ha quedado demostrado en numerosos experimentos que ya se han citado anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo ha sido realizado utilizando la tecnología *time-lapse* denominada Eeva (Early Embryo Viability Assessment). El sistema Eeva consta de varios microscopios invertidos de campo oscuro que toman una imagen de los embriones a intervalos regulares de cinco minutos, mientras los embriones permanecen en la incubadora. También consta de un ordenador y otros componentes como: la caja de control, la pantalla y una impresora. Así mismo, incorpora el software para la captura de las imágenes y para su conversión en un vídeo, una base de datos de los pacientes y otro software de análisis morfocinético que identifica de forma automática los eventos durante el desarrollo embrionario, compara los tiempos de división y hace una predicción sobre la capacidad del embrión para llegar a estado de blastocisto^[18].

Este sistema debe ser usado con unas placas de cultivo especiales, las placas Eeva, que constan de micropocillos individuales en la parte central. Cada placa se usa para los embriones de un único paciente, y cada micropocillo está identificado con unas letras y números para facilitar el seguimiento del embrión. El incubador del Eeva está dividido en

varias secciones, o *Scopes*. En cada *Scope* solo puede colocarse una placa, que encaja únicamente en una posición determinada^[18].

Cada *Scope* se compone de un microscopio invertido que utiliza un sistema de iluminación LED de baja intensidad. El microscopio usa luz roja de una longitud de onda de 625 nm para captar la imagen de los embriones en campo oscuro. Se utilizan una serie de lentes que proyectan la imagen de los embriones a un sensor de imagen. El aumento del sistema es de 2.5x. Además, el sistema controla la potencia de iluminación para conseguir unos niveles de exposición media en el sensor. La captación de una imagen requiere 0,6 segundos de exposición. Tras tres días, el embrión ha sido expuesto a una energía de 114mJ/cm², una energía menor que a la que estarían expuestos en un microscopio invertido de los que se usan normalmente en los laboratorios de reproducción asistida, por lo que los embriones son sometidos a la mínima exposición de luz^[18].

Varios estudios compararon embriones sometidos a la tecnología *time-lapse* con embriones de una incubadora normal, y no encontraron ningún efecto negativo sobre la tasa de fecundación, el desarrollo embrionario, la formación de blastocisto o la tasa de implantación. También se comprobó que no se afectaba la expresión génica a partir de embriones de ratón sometidos a tecnología *time-lapse* de campo oscuro^[19].

La ventaja de contar con el Eeva en el laboratorio de reproducción asistida es que el software incorpora el sistema de análisis morfocinético que permite la clasificación de los embriones en tres categorías: *High* (resaltados en la pantalla del Eeva en color verde), *Medium* (resaltados en naranja) y *Low* (resaltados en amarillo). Los embriones clasificados como *High* son los que tienen mayor probabilidad de implantación, seguidos por los *Medium*, y finalmente por los *Low*^[15] (Figura 3).

Para hacer esta clasificación, el software mide dos parámetros cinéticos: el tiempo desde que el embrión pasa de dos células a tres células (P2) y el tiempo que tarda en pasar de tres células a cuatro células (P3), (Figura 4). Estos dos parámetros fueron validados en varios estudios, demostrando que el desarrollo hasta blastocisto y el éxito de la implantación correlacionaban con ambos tiempos de división^[2, 3, 19]. Además también tiene en cuenta el tamaño y forma de los blastómeros, parámetros morfológicos, de ahí que se denomine morfocinético.

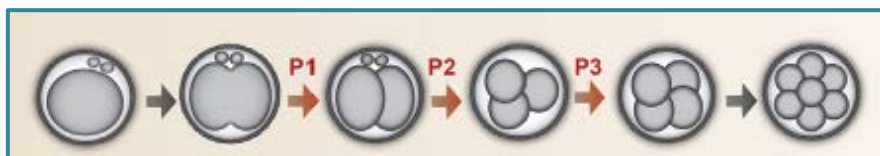


Figura 4. Representación de los tiempos P2 y P3 que mide el Eeva. El P2 mide el tiempo desde que el embrión está en estado de dos células hasta que pasa a tres. El P3 mide el tiempo desde que el embrión está en tres células y pasa a cuatro. El Eeva no mide el tiempo P1, por lo que fue uno de los parámetros que se midió en el presente trabajo. **Conaghan et al., 2013, Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial, Fertility and Sterility, vol 100, 412-419.**

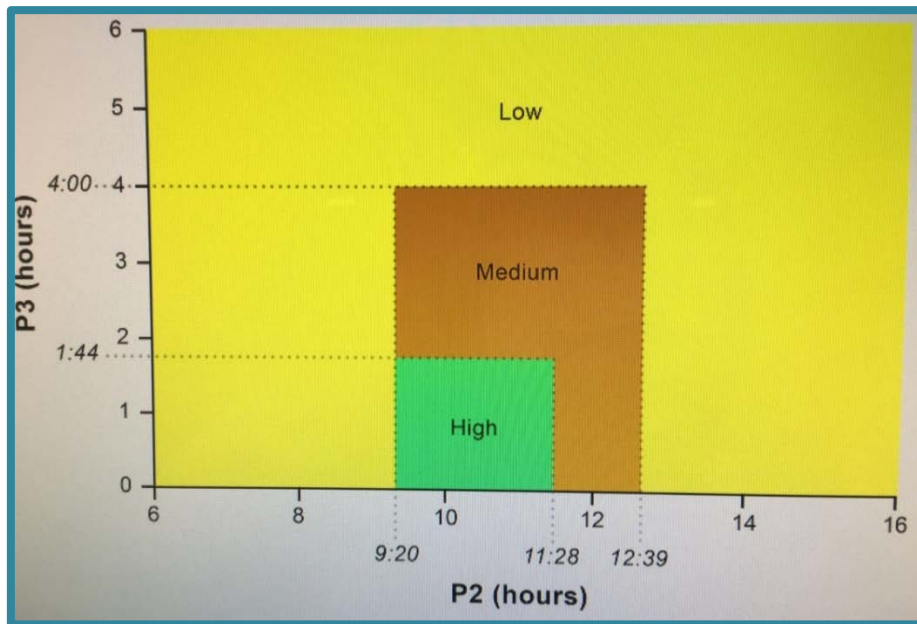


Figura 3. Gráfico que representa los tiempos P2 y P3 que utiliza el software del Eeva para clasificar los embriones en *High*, *Medium* o *Low*. Un embrión es clasificado como *High* cuando su P2 está entre 560 y 688 minutos y su P3 entre 0 y 104 minutos (zona verde). Un embrión es clasificado como *Medium* cuando su P2 está entre 560 y 759 minutos y su P3 entre 0 y 240 minutos (zona naranja). Finalmente, un embrión es clasificado como *Low* cuando su P2 y P3 está fuera del rango de los anteriores (zona amarilla).

Puesto que al fin y al cabo se trata de una máquina, y no es perfecta, existe la posibilidad de modificar esta clasificación. El investigador puede repasar el vídeo y cambiar los parámetros P2 y P3 si considera que el Eeva no ha reconocido bien las divisiones, y el embrión vuelve a ser clasificado de acuerdo a los nuevos tiempos introducidos.

OBJETIVOS

El presente trabajo consistió en el análisis morfocinético de 663 vídeos de embriones obtenidos por tecnología *time-lapse* para:

- Estudio de varios parámetros, durante la primera división embrionaria, que afectan a la calidad y viabilidad del embrión, a partir de embriones de pacientes del Hospital QuirónSalud de Zaragoza. Estos parámetros fueron: reabsorción, fragmentación, tipo de división (normal, anormal o caótica) y tiempo entre la desaparición de PN y la primera división embrionaria.
- Relacionar todos los parámetros entre sí, y con el recuento espermático, en especial con el factor masculino severo, con el objetivo de determinar si existe una correlación.
- Relacionar todos los parámetros analizados con las tasas de embarazo, con el objetivo de determinar cuál es el parámetro que más afecta al embarazo y si alguno de ellos puede usarse como indicador a la hora de elegir los embriones de mejor calidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron un total de 663 embriones pertenecientes a 102 ciclos de FIV/ICSI (Fecundación In Vitro/Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides). No todos los embriones y ciclos se pudieron utilizar para todas las comparaciones, dado que en algunos no fue posible la obtención de todos los datos necesarios. Para determinar si las variaciones eran estadísticamente significativas se llevó a cabo el test u de Mann-Whitney para dos muestras independientes.

Reabsorción

De los 663 embriones analizados, 237 embriones (35,7%) sufrían reabsorción y 426 embriones (64,3%) no la sufrían (Figura 5).

Fragmentación

De los 663 embriones analizados, 325 embriones (49%) tenían fragmentación y 339 embriones (51%) no la presentaban (Figura 5).

Tipo de división

De los 663 embriones analizados, 521 (78,6%) presentaban una división normal, 72 (10,9%) tenían una división anormal y 70 embriones (10,6%) presentaban una división caótica (Figura 5).

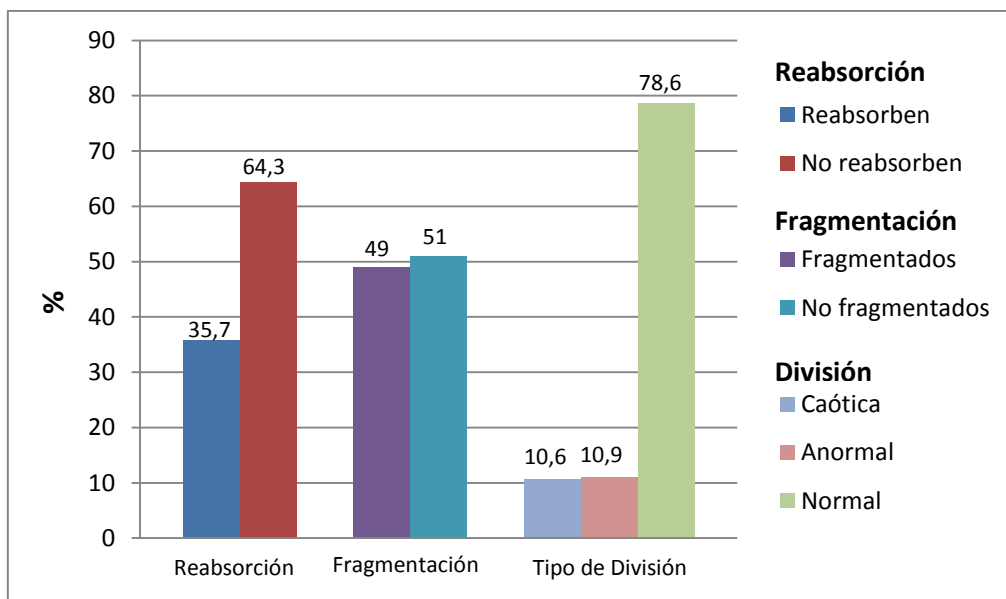


Figura 5. Gráfico en el que se representa la reabsorción, fragmentación y tipo de división, en porcentaje de embriones. Se observa que la alteración más frecuente es la fragmentación, seguido de la reabsorción, y finalmente las anomalías en la división.

Recuento espermático

De los 663 embriones analizados, 122 (18,4%) procedían de sémenes con una concentración inferior o igual a 1 millón de espermatozoides/ml (factor masculino severo), 238 embriones (35,9%) procedían de sémenes con un recuento superior a 1 millón de espermatozoides/ml e

inferior a 15 millones/ml (factor masculino), y 303 embriones (45,7%) procedían de sémenes con un recuento mayor o igual a 15 millones de espermatozoides/ml (Figura 6).



Figura 6. Gráfico que representa el recuento espermático de los sémenes usados para obtener los embriones analizados. Solo un 45,7% de los sémenes eran de buena calidad (considerados normales según los criterios de la OMS), mientras que un 54,3% procedían de hombres con problemas de infertilidad, tanto factor masculino severo como factor masculino.

Tasa de embarazo

Para la tasa de embarazo se trabajó con número de ciclos, teniendo en cuenta solo los embriones que habían sido transferidos a la mujer en cada ciclo. De esta forma, de los 102 ciclos analizados: 35 ciclos tuvieron como resultado No Embarazo, 63 ciclos resultaron en Embarazo, 1 ciclo resultó en mala evolución, y para 3 de los ciclos no se disponía del resultado. Por tanto, se trabajó solo con los ciclos en los que el resultado había sido Embarazo o No Embarazo: un total de 98 ciclos, en los que el 35,7% fueron No Embarazo y el 64,3% fueron Embarazo. Solo se sabía qué embriones habían sido transferidos en 94 de los ciclos.

Lo normal es transferir dos embriones a cada mujer por ciclo, y es imposible saber cuál de ellos es el que ha seguido evolutivo en caso de que al final solo nazca un bebé. Se considera embarazo clínico cuando la β -hCG (hormona producida por el embrión) sérica medida 16 días después de la extracción de los ovocitos se encuentra en una concentración superior a 10 UI/L, y se comprueba latido cardíaco dos semanas después de la medida de la β -hCG. Este valor varía ligeramente para distintos hospitales, ya que depende del margen de error que tiene el test con el que se mida.

Afectación de la reabsorción según el tipo de división embrionaria

Partiendo de los datos del apartado Tipo de división, se observó que de los 521 embriones que presentan un patrón de división normal, 156 embriones (29,8%) reabsorben. De los 72 embriones que presentan división anormal, 39 de ellos (40,3%) reabsorben, y de los 70 embriones que tienen división caótica, 46 embriones (65,7%) reabsorben (Figura 7).

Las variaciones encontradas en los porcentajes de reabsorción del grupo que presentaba división normal frente al grupo de división anormal fueron estadísticamente significativas ($P = 4,2 \times 10^{-5}$), al igual que las encontradas entre el grupo de división normal frente al grupo de división caótica ($P = 3,2 \times 10^{-9}$). Sin embargo, las diferencias entre el grupo que presentaba división anormal y el que presentaba división caótica no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,16$), (Tabla 2).

Los resultados encontrados concuerdan con el hecho de que, muchas veces, las divisiones caóticas también presentan reabsorción. La reabsorción, por tanto, es mayor cuando hay alteraciones en la división, sin que haya diferencias significativas entre que la alteración sea por división anormal o por división caótica.

Afectación de la reabsorción según el recuento espermático

Como se ha comentado en el apartado de recuento espermático, 122 embriones procedían de sémenes de hombres con factor masculino severo. De estos 122 embriones, 55 embriones (45,1%) reabsorben. De los 238 embriones que procedían de sémenes con un recuento superior a 1 millón espermatozoides/ml pero menor de 15 millones/ml, 79 embriones (33,2%) reabsorben. Finalmente, de los 303 embriones que procedían de sémenes con un recuento superior a 15 millones/ml, 103 embriones (34%) reabsorben (Figura 7).

Las diferencias encontradas en los porcentajes de reabsorción entre el grupo que tiene un recuento inferior o igual a 1 millón/ml y el que tiene un recuento superior a 1 millón/ml pero menor de 15 millones/ml fueron estadísticamente significativas ($P = 0,027$), al igual que las encontradas entre el grupo que tiene un recuento inferior o igual a 1 millón/ml y el grupo que tiene un recuento superior o igual a 15 millones/ml ($P = 0,033$). Sin embargo, las diferencias encontradas entre el grupo que tiene un recuento superior a 1 millón/ml pero inferior a 15 millones/ml, y el grupo con un recuento superior o igual a 15 millones/ml, no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,85$), (Tabla 3).

Ningún estudio anterior había relacionado la reabsorción con el factor masculino severo. De hecho, era uno de los puntos clave de este trabajo. Según los datos, se da más reabsorción cuando el semen procede de pacientes con factor masculino severo, a pesar de que se hace una selección genética durante la ICSI (llamada PICSI, cuando incorpora esta selección), técnica de fecundación que se lleva a cabo cuando el número de espermatozoides de la muestra seminal es bajo, con el objetivo de potenciar la fecundación. En cuanto el semen tiene un recuento mayor, el aumento de reabsorción ya no es estadísticamente significativo.

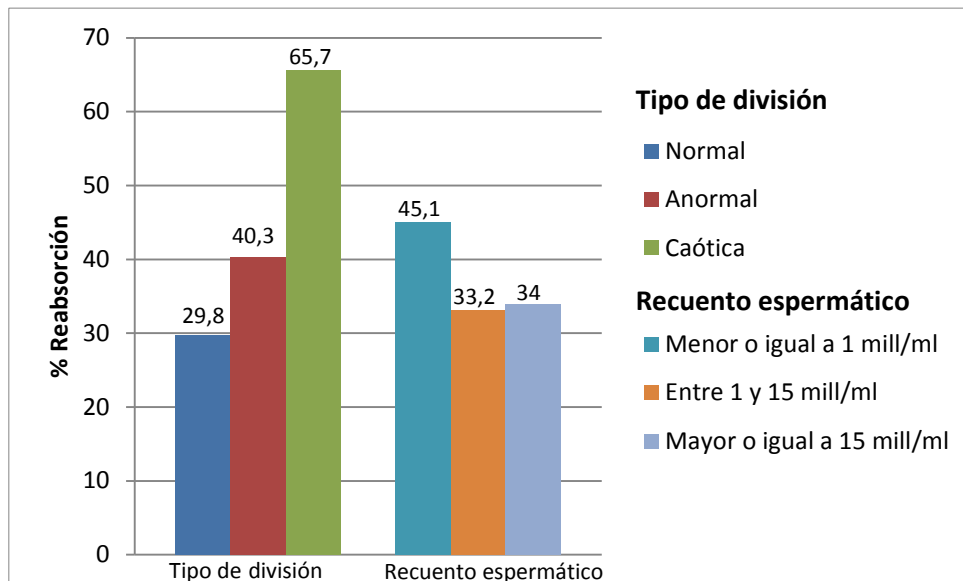


Figura 7. Gráfico que representa el porcentaje de reabsorción en función del tipo de división y del recuento espermático. Con respecto al tipo de división, el porcentaje de reabsorción aumenta cuando hay alguna alteración en la división (más en la caótica que en la anormal, pero ambos porcentajes son mayores que el de la división normal). Con respecto al recuento espermático, el porcentaje de reabsorción es mayor cuando el semen tiene un recuento inferior o igual a 1 millón de espermatozoides/ml.

Afectación de la fragmentación según el tipo de división embrionaria

Partiendo de los datos del apartado Tipo de división, se encontró que de los 521 embriones que tienen una división normal, 206 embriones (39,5%) están fragmentados. De los 72 embriones que presentan una división anormal, 39 embriones (54,2%) tienen fragmentación; y de los 70 embriones que muestran una división caótica, los 70 (100%) están fragmentados (consecuencia de la definición de división caótica, en la que el embrión está tan fragmentado que no es posible contar el número de células), (Figura 8).

Las diferencias encontradas en el porcentaje de fragmentación entre el grupo que tenía división normal y el que tenía división anormal fueron estadísticamente significativa ($P=0,018$). Las variaciones encontradas entre el grupo que presentaba división normal frente al que presentaba división caótica, así como las encontradas entre el grupo que tiene división anormal frente al que presenta división caótica, también fueron significativas ($P = 1,9 \times 10^{-21}$, $P = 1,2 \times 10^{-10}$, respectivamente), (Tabla 2).

Puesto que en la definición de división caótica va incorporada la fragmentación, todos los embriones con este tipo de división debían estar fragmentados. La mayor fragmentación observada cuando la división es anormal puede deberse a que embriones con este tipo de división van a tener probablemente anomalías genéticas, relacionadas con la fragmentación^[7]. Por tanto, la fragmentación, igual que ocurría con la reabsorción, aumenta cuando aparecen alteraciones en la división. Sin embargo, en este caso, sí hay diferencias significativas entre división anormal y caótica.

Afectación de la fragmentación según el recuento espermático

Partiendo de los datos del apartado Recuento espermático, se observó que de los 122 embriones que procedían de sémenes con un recuento inferior o igual a 1 millón de espermatozoides/ml, 61 embriones (50%) estaban fragmentados. De los 238 embriones que procedían de sémenes con un recuento mayor que 1 millón/ml pero menor que 15 millones/ml, 105 embriones (44,1%) presentaban fragmentación. Y de los 303 embriones que procedían de sémenes con un recuento superior o igual a 15 millones/ml, 159 embriones (52,5%) tenían fragmentación. Ninguna de las variaciones encontradas fue estadísticamente significativa (Figura 8 y Tabla 3).

Fue sorprendente que el mayor porcentaje de fragmentación se diera en los sémenes que en principio tienen mejor calidad, ya que el recuento está dentro de los rangos determinados por las OMS para sémenes normales. Esto podría demostrar que aquellos sémenes con un recuento bajo no tienen por qué contener espermatozoides con anomalías genéticas u otro tipo de alteraciones.

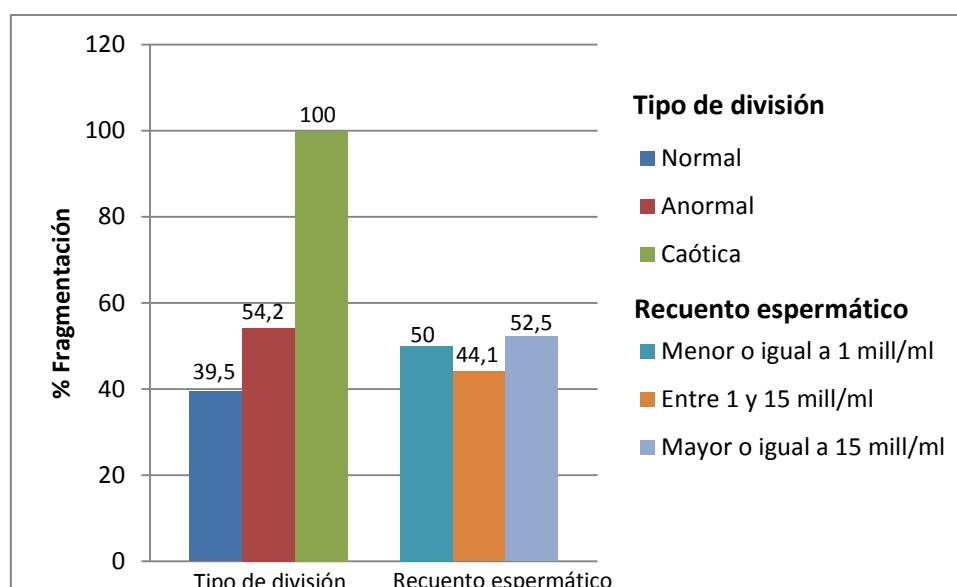


Figura 8. Gráfico que representa el porcentaje de fragmentación en función del tipo de división y del recuento espermático. Al igual que ocurría con la reabsorción, el porcentaje de fragmentación también aumenta cuando se dan alteraciones en la división (mayor en los embriones con división anormal que en los de división normal). El 100% de los embriones caóticos están fragmentados, debido a la definición de división caótica. Con respecto al recuento espermático, se obtiene prácticamente el mismo porcentaje de fragmentación cuando hay factor masculino severo que cuando el semen tiene un recuento normal.

Afectación del tipo de división según el recuento espermático

Partiendo de los datos del apartado Recuento espermático, y para un total de 663 embriones, se observó que: de los 122 embriones que procedían de sémenes con un recuento inferior o igual a 1 millón de espermatozoides/ml, 95 de ellos (77,9%) tenían una división normal, 15 embriones (12,3%) presentaban división anormal y 12 embriones (9,8%) tenían división caótica, siendo 27 embriones (22,1%) en total los que presentaban anomalías en la división.

De los 238 embriones que procedían de sémenes con un recuento superior a 1 millón/ml pero inferior a 15 millones/ml, 194 embriones (81,5%) tenían división normal, 23 embriones (9,7%) presentaban división anormal, y 21 embriones (8,8%) tenían división caótica, siendo 44 embriones (18,5%) en total los que presentaban anomalías en la división.

De los 303 embriones que procedían de sémenes con un recuento superior o igual a 15 millones/ml, se encontró que 232 embriones (76,6%) presentaban un patrón de división normal, 34 embriones (11,2%) tenían división anormal y 37 embriones (12,2%) tenían división caótica, siendo 71 embriones (23,4%) en total los que presentan anomalías en la división (Figura 9).

Ninguna de las diferencias encontradas fue estadísticamente significativa (Tabla 3). En ningún estudio previo se había analizado esto, y no parece, a la vista de estos resultados, que el número de espermatozoides del semen esté relacionado con más alteraciones en la división, corroborando nuevamente que un bajo recuento no implica espermatozoides con anomalías genéticas o con otras alteraciones.

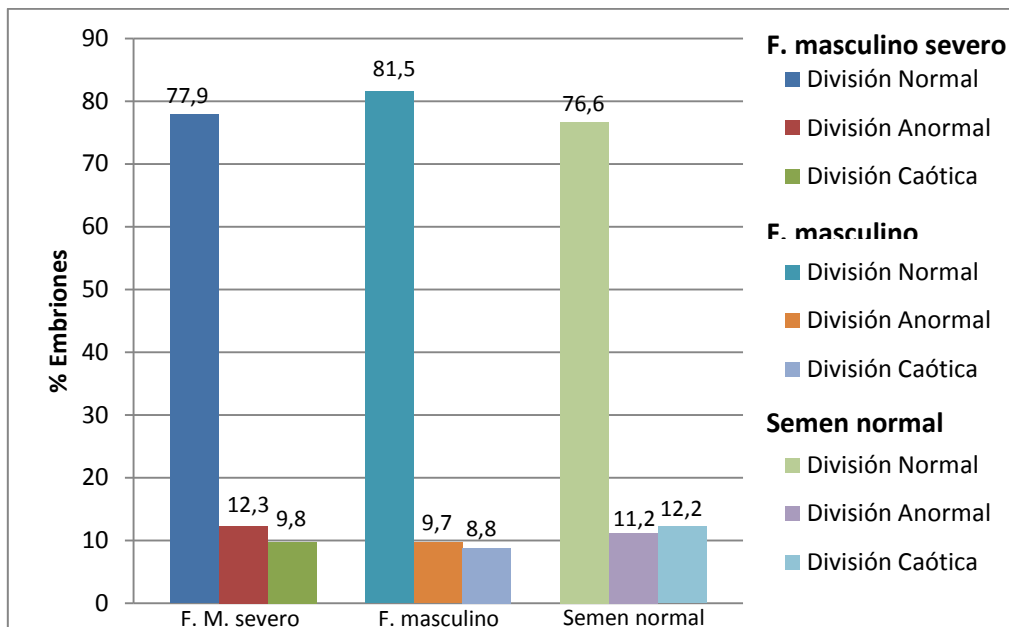


Figura 9. Gráfico que representa el porcentaje de embriones que tienen un tipo de división concreta en función del recuento espermático. Se observó una disminución de alteraciones en la división cuando se pasaba de factor masculino severo (recuento inferior o igual a 1 millón espermatozoides/ml) a solo factor masculino (recuento entre 1 y 15 millones/ml), pero volvían a aumentar cuando el semen era normal (recuento mayor o igual a 15 millones/ml).

Afectación del tiempo entre desaparición de PN y primera división según el tipo de división, la reabsorción y la fragmentación

Para analizar este conjunto de datos se dividieron los embriones en nueve grupos: división normal, no reabsorción y no fragmentación (236 embriones); división normal, reabsorción y no fragmentación (152 embriones); división normal, no reabsorción y fragmentación (198 embriones); división normal, reabsorción y fragmentación (92 embriones); división anormal, no reabsorción y no fragmentación (23 embriones); división anormal, reabsorción y no

fragmentación (28 embriones); división anormal, no reabsorción y fragmentación (36 embriones); división anormal, reabsorción y fragmentación (22 embriones); y división caótica (70 embriones). En la división caótica no se diferenció si había reabsorción y/o fragmentación porque la propia definición de división caótica implica fragmentación y muchas veces se da acompañada de reabsorción. Las medias de los tiempos entre la desaparición de PN y primera división para los distintos grupos se recogen en la Figura 10 y en la Tabla 1.

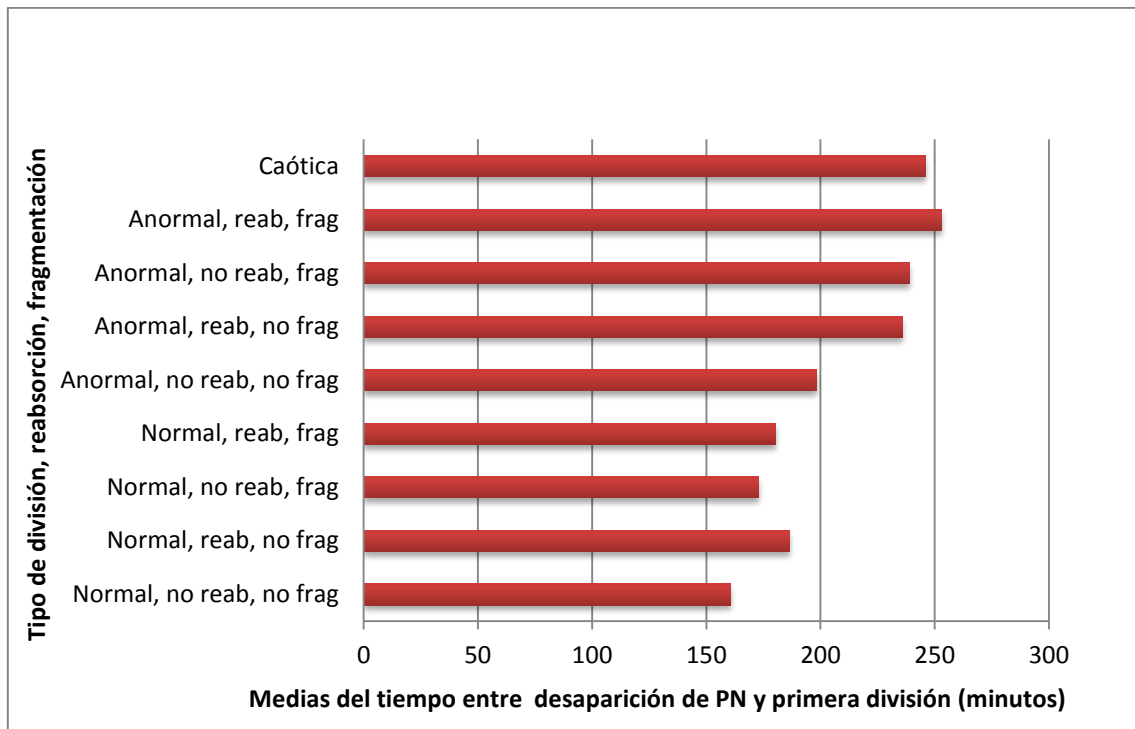


Figura 10. Gráfico que representa las medias del tiempo entre la desaparición de PN y la primera división frente al tipo de división, en combinación con la reabsorción y la fragmentación. Se puede observar que la menor de las medias es la de los embriones con división normal y que no tienen reabsorción ni fragmentación (embriones control, sin ninguna alteración). El resto de medias, que se corresponden con embriones que presentan alguna alteración (bien en el tipo de división o bien reabsorben o están fragmentados), son en todos los casos mayores, siendo la mayor de todas la correspondiente a embriones con división anormal, reabsorción y fragmentación.

	Media(min)	Desviación estándar(min)	Moda (min)	Rango (min)	Mínimo (min)	Máximo (min)	Nivel de confianza(95,0%)
Div normal, no reab, no frag	160,7	38,2	160	350	30	380	4,9
Div normal, reab, no frag	186,3	110	165	845	80	925	17,6
Div normal, no reab, frag	173	67,6	150	695	15	710	9,5
Div normal, reab, frag	180,4	87,2	150	630	80	710	18
Div anormal, no reab, no frag	198,3	138,5	150	635	10	645	59,9
Div anormal, reab, no frag	236	171,7	180	710	115	825	66,6
Div anormal, no reab, frag	239	168,6	180	755	70	825	57
Div anormal, reab, frag	252,9	190	180	710	115	825	84,3
Div caótica	245,7	239	160	1265	55	1320	57

Tabla 1. Para cada grupo en los que se dividieron los embriones, se recoge la media del tiempo entre desaparición de PN y primera división, la desviación estándar, la moda, el rango de valores que había en cada grupo, el mínimo tiempo observado, el máximo y el nivel de confianza para la media. Las desviaciones estándar, y los niveles de confianza son muy variados. Aquellos grupos que los tienen muy altos es debido a que había varios embriones que tenían un tiempo entre desaparición de PN y primera división muy alto con respecto a la media. Puesto que no se trataba de casos aislados, esos datos se dejaron en el análisis.

Dado que algunas desviaciones estándar son bastante elevadas, se puede considerar que la media no es representativa. Por eso, se procedió a analizar si las diferencias entre las poblaciones eran estadísticamente significativas. Se utilizó como control el grupo en el que la división de los embriones era normal, no reabsorbían ni tenían fragmentación, y se comparó con el resto de grupos. Las variaciones entre el grupo control y los embriones con división normal, reabsorción y no fragmentación no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,10$). Las variaciones entre el grupo control y los embriones que tenían división normal, no reabsorción y fragmentación sí fueron estadísticamente significativas ($P = 0,025$). Las variaciones entre el grupo control y los embriones que presentaban división normal, reabsorción y fragmentación no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,079$).

Las variaciones entre el grupo control y los embriones que tenían división anormal, no reabsorción y no fragmentación tampoco fueron estadísticamente significativas ($P = 0,16$). Las variaciones entre el grupo control y los embriones que presentaban división anormal, reabsorción y no fragmentación, así como con los embriones que presentaban división anormal, no reabsorción y fragmentación, fueron significativas ($P = 0,0094$ y $0,00093$, respectivamente). Asimismo, las diferencias entre el grupo control y los embriones que presentaban división anormal, reabsorción y fragmentación también fueron estadísticamente significativas ($P = 0,0045$).

Finalmente, las variaciones entre el grupo control y el grupo de embriones con división caótica también fueron estadísticamente significativas ($P = 2,8 \times 10^{-5}$), (Tabla 2).

Afectación de todos los parámetros según el tipo de división	P	Se afecta/No se afecta
Reabsorción		
División normal vs. Anormal	4,2e ⁻⁵	Se afecta
División normal vs. Caótica	3,2e ⁻⁹	
Fragmentación		
División normal vs. Anormal	0,018	Se afecta
División anormal vs. Caótica	1,9e ⁻²¹	
Tiempo entre la desaparición de PN y primera división		
Div. control vs. normal, reabsorción, no fragmentación	0,10	Se afecta
Div. control vs. normal, no reabsorción, fragmentación	0,025	
Div. control vs. normal, reabsorción, fragmentación	0,079	
Div. control vs. anormal, no reabsorción, no fragmentación	0,16	
Div. control vs. anormal, reabsorción, no fragmentación	9,4e ⁻³	
Div. control vs. anormal, no reabsorción, fragmentación	9,3e ⁻⁴	
Div. control vs. anormal, reabsorción, fragmentación	4,5e ⁻³	
Div. control vs. división caótica	2,8e ⁻⁵	

Tabla 2. Resumen de la afectación de todos los parámetros según el tipo de división. Todos los parámetros se ven afectados de forma significativa cuando se dan alteraciones en la división.

Afectación del tiempo entre desaparición de PN y primera división según el recuento espermático

El tiempo entre la desaparición de PN y primera división se pudo calcular para 618 embriones, de los cuales: 117 embriones procedían de sémenes con un recuento inferior o igual a 1 millón/ml, 214 embriones de sémenes con un recuento mayor de 1 millón/ml pero menor de 15 millones/ml, y 287 procedían de sémenes con un recuento mayor o igual a 15 millones/ml.

La media del tiempo entre desaparición de PN y primera división para los embriones que procedían de sémenes con un recuento inferior o igual a 1 millón/ml fue de $177,9 \pm 87,6$ minutos; para los embriones que procedían de sémenes con un recuento entre 1 y 15 millones/ml, la media fue de $181,4 \pm 101,1$ minutos; y la media para los embriones que procedían de sémenes con un recuento superior o igual a 15 millones/ml fue de $179,1 \pm 101,5$ minutos. Ninguna de las variaciones fue estadísticamente significativa, por lo que se puede concluir que el recuento espermático no afecta al tiempo entre la desaparición de PN y la primera división (Tabla 3).

Afectación de todos los parámetros según el recuento espermático	P	Se afecta/No se afecta
Reabsorción		
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. entre 1-15 mill/ml	0,027	Se afecta
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. mayor o igual a 15 mill/ml	0,033	
Fragmentación		
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. entre 1-15 mill/ml	0,29	No se afecta
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. mayor o igual a 15 mill/ml	0,64	
Tiempo entre la desaparición de PN y primera división		
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. entre 1-15 mill/ml	0,99	No se afecta
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. mayor o igual a 15 mill/ml	0,72	
Tipo de división		
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. entre 1-15 mill/ml	0,41	No se afecta
Rec. menor o igual a 1 mill/ml vs. Rec. mayor o igual a 15 mill/ml	0,77	

Tabla 3. Afectación de todos los parámetros en función del recuento espermático. El único parámetro que se afecta cuando el semen presenta factor masculino severo es la reabsorción, produciéndose un aumento de la misma. El resto de parámetros no parecen depender de la concentración de espermatozoides que haya en el semen.

Afectación de la tasa de embarazo según la reabsorción

Para analizar esto se hicieron tres grupos: resultado cuando ninguno de los embriones transferidos reabsorbe, cuando uno de los embriones transferidos reabsorbe y cuando dos o todos los embriones transferidos reabsorben.

De un total de 94 ciclos, se obtuvo lo siguiente: había 38 ciclos en los que ningún embrión transferido reabsorbía. De ellos, 24 ciclos (63,2%) tuvieron como resultado Embarazo, y 14 ciclos (36,8%) fueron No Embarazo. Había 39 ciclos en los que uno de los embriones transferidos reabsorbía. De ellos, 25 ciclos (64%) fueron Embarazo y 14 ciclos (35,8%) fueron No Embarazo. Finalmente, había 17 ciclos en los que dos o todos los embriones que se transfirieron reabsorbían. De ellos, 13 ciclos (75,5%) dieron como resultado Embarazo y 4 ciclos fueron No Embarazo (23,5%), (Figura 11). Ninguna de las variaciones encontradas fue estadísticamente significativa (Tabla 4).

Estos resultados fueron sorprendentes. Lo que se esperaba es que cuantos más embriones transferidos reabsorbieran, menor fuese la tasa de embarazo, ya que como se ha comentado previamente, la reabsorción puede llevar consigo anomalías genéticas, muy relacionadas con la fragmentación. Sin embargo, los resultados sugieren que la tasa de embarazo es mayor cuando todos, o al menos dos de los embriones transferidos, reabsorben. De momento no se dispone de otros estudios que puedan corroborar o desmentir esto, y tampoco que puedan explicarlo.

Afectación de la tasa de embarazo según el tipo de división embrionaria

Para analizar los datos de este apartado se dividieron los 94 ciclos en tres grupos: un primer grupo en el que todos los embriones transferidos tenían una división normal; un segundo

grupo en el que uno de los embriones transferidos presentaba una división bien anormal, bien caótica; y un tercer grupo en el que dos o todos los embriones transferidos presentaban una división anormal y/o caótica.

Había 82 ciclos en los que todos los embriones transferidos tenían una división normal. De ellos, 60 ciclos (73,2%) tuvieron como resultado Embarazo, y 22 ciclos (26,7%) tuvieron como resultado No Embarazo. Había 7 ciclos en los que uno de los embriones transferidos tenía una división bien anormal, bien caótica. De ellos, 2 ciclos (28,6%) fueron Embarazo y 5 ciclos (71,4%) fueron No Embarazo. Finalmente, había 5 ciclos en los que dos o todos los embriones transferidos tenían división anormal y/o caótica. De ellos, solo 1 ciclo (20%) tuvo como resultado Embarazo, y 4 ciclos (80%) fueron No Embarazo (Figura 11).

Las diferencias encontradas en el porcentaje de embarazo entre el grupo en el que todos los embriones transferidos tenían división normal y el grupo en el que uno de los transferidos tenía división anormal o caótica fueron estadísticamente significativas ($P = 0,014$), al igual que las encontradas entre el grupo en el que todos los embriones transferidos tenían división normal, y el grupo en el que dos o todos los embriones transferidos presentaban división anormal y/o caótica ($P = 0,012$). Sin embargo, las diferencias entre el grupo en el que uno de los embriones transferidos tenía división normal o caótica y el grupo en el que dos o todos los embriones transferidos tenían división anormal y/o caótica, no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,88$), (Tabla 4).

En este caso, los resultados obtenidos fueron los esperados: el porcentaje de embarazo disminuye drásticamente cuando los embriones transferidos presentan alteraciones en la división, aunque sin importar que se transfieran uno dos 2 embriones alterados.

Afectación de la tasa de embarazo según la fragmentación

Para analizar estos datos, de nuevo los 94 ciclos totales se dividieron en tres grupos: un primer grupo en el que ninguno de los embriones transferidos presentaba fragmentación, un segundo en el que uno de los embriones transferidos tenía fragmentación, y un tercero en el que dos o todos los embriones transferidos estaban fragmentados.

Había 35 ciclos en los que ningún embrión transferido tenía fragmentación. De ellos, 29 ciclos (82,9%) tuvieron como resultado Embarazo y 6 ciclos (17,1%) fueron No Embarazo. Había 32 ciclos en los que uno de los embriones transferidos tenía fragmentación. De ellos, 15 ciclos (46,9%) fueron Embarazo y 17 ciclos (53,1%) tuvieron como resultado No Embarazo. Finalmente, había 27 ciclos en los que dos o todos los embriones transferidos presentaban fragmentación. De ellos, 18 ciclos (66,7%) resultaron en Embarazo, y 9 ciclos (33,3%) fueron No Embarazo (Figura 11).

Las diferencias encontradas entre el grupo en el que ningún embrión transferido presentaba fragmentación, y el grupo en el que uno de los embriones tenía fragmentación, fueron estadísticamente significativas ($P = 0,002$). Sin embargo, ni las diferencias encontradas entre el grupo en el que ningún embrión transferido tenía fragmentación y el grupo en el que dos o todos los embriones tenían fragmentación, ni las diferencias entre el grupo en el que uno de los embriones estaba fragmentado y el grupo en el que dos o todos los embriones estaban

fragmentados, fueron estadísticamente significativas ($P = 0,14$, $P = 0,13$, respectivamente), (Tabla 4).

En principio, cabía esperar que el porcentaje de embarazo fuera menor cuantos más embriones fragmentados se transfirieran. Sin embargo, aunque sí que hay menos porcentaje de embarazo cuando se pasa de transferir cero embriones fragmentados, a uno fragmentado, el porcentaje vuelve a aumentar cuando se transfieren dos o todos los embriones fragmentados. Estas variaciones pueden deberse a que no todos los embriones presentan el mismo grado de fragmentación. Dado que un alto porcentaje de los embriones obtenidos por fecundación in vitro presentan fragmentación, se intenta elegir para la transferencia aquellos que presentan un menor grado de fragmentación. Aquellos altamente fragmentados solo se transfieren cuando no hay otros que puedan ocupar su lugar. Este análisis podría repetirse estableciendo distintos grados de fragmentación, para ver de forma más rigurosa si realmente la fragmentación afecta a la tasa de embarazo.

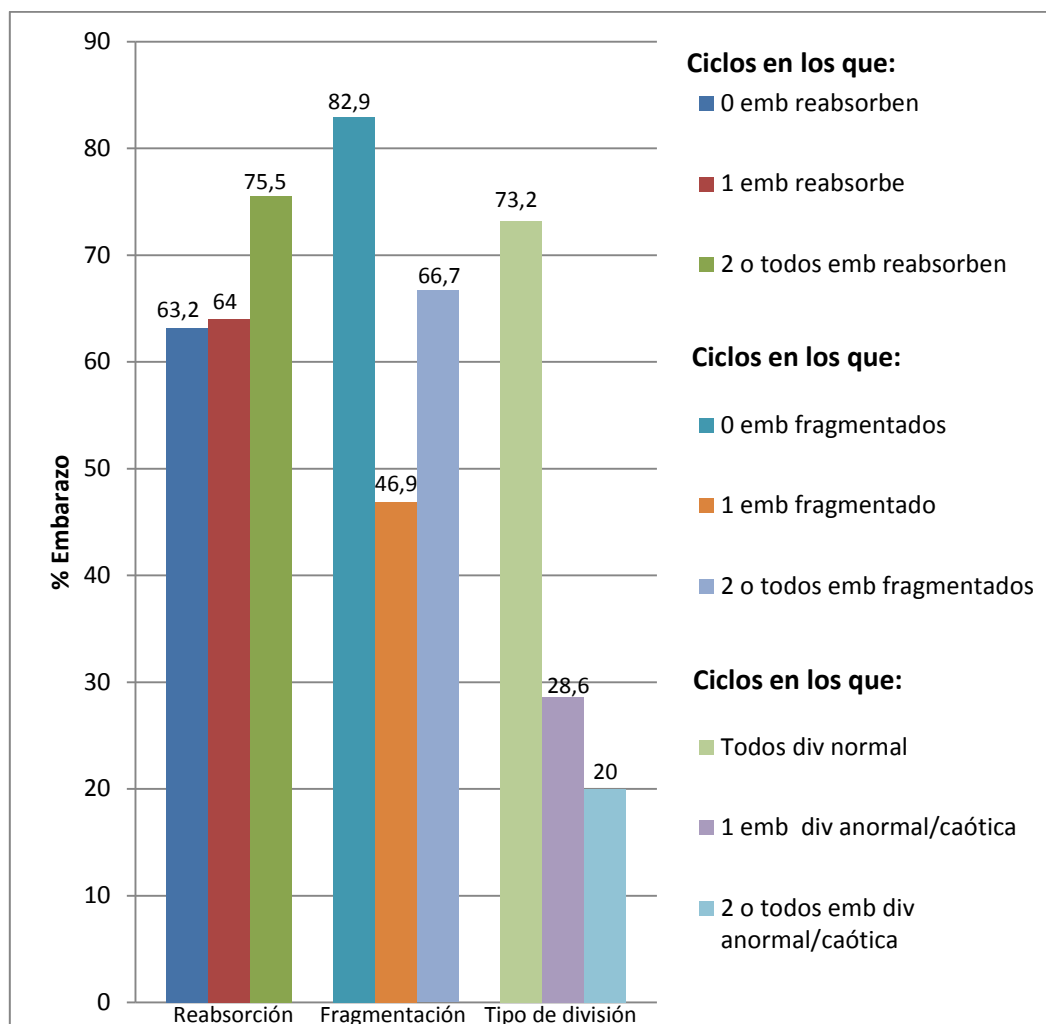


Figura 11. Gráfico que representa la tasa de embarazo en función de la reabsorción, la fragmentación y el tipo de división. Con respecto a la reabsorción, cabría esperar que la tasa de embarazo disminuyera cuantos más embriones con reabsorción se transfirieran, pero se ha observado todo lo contrario. Con respecto a la fragmentación, el porcentaje de embarazo disminuye cuando se transfiere algún embrión fragmentado, si bien cabría esperar que fuera

menor cuando dos o todos los embriones estuvieran fragmentados, cosa que no se observó. Finalmente, el porcentaje de embarazo disminuye drásticamente cuando los embriones transferidos presentan alguna alteración en la división.

Afectación de la tasa de embarazo según el tiempo entre desaparición de PN y primera división

La media de los tiempos entre la desaparición de PN y primera división de aquellos embriones que dieron como resultado Embarazo fue de $160,5 \pm 29,9$. La media para los embriones que dieron como resultado No Embarazo fue de $167,9 \pm 49,4$. Esta variación no fue estadísticamente significativa (Tabla 4).

Afectación de la Tasa de embarazo	P	Se afecta/No se afecta
Reabsorción		
0 embriones reabsorben vs. 1 embrión reabsorbe	0,93	No se afecta
0 embriones reabsorben vs. 2/todos embriones reabsorben	0,34	
1 embrión reabsorbe vs. 2/todos embriones reabsorben	0,37	
Fragmentación		
0 embriones fragmentados vs. 1 embrión fragmentado	0,002	No se afecta (*) ¹
0 embriones fragmentados vs. 2/todos embriones fragmentados	0,14	
1 embrión fragmentado vs. 2/todos embriones fragmentados	0,13	
Tipo de división		
Todos los embriones división normal vs. 1 anormal/caótico	0,014	Se afecta
Todos los embriones división normal vs. 2/todos anormales/caóticos	0,012	
1 embrión anormal/caótico vs. 2/todos anormales/caóticos	0,88	
Tiempo entre la desaparición de PN y primera división		
Tiempo embriones Embarazo vs tiempo embriones No Embarazo	0,17	No se afecta (*) ²

Tabla 4. Resumen de la afectación de la tasa de embarazo según la reabsorción, fragmentación, tipo de división y tiempo entre desaparición de PN y primera división de los embriones transferidos. La reabsorción no afecta a la tasa de embarazo de forma significativa. Con respecto a la fragmentación, se observa variación significativa cuando se pasa de cero embriones fragmentados a un embrión fragmentado, pero el resto de variaciones no fueron estadísticamente significativas. El tipo de división afecta significativamente a la tasa de embarazo, pero no el tiempo entre la desaparición de PN y primera división. (*)¹ Aunque las variaciones no fueron estadísticamente significativas, sí se observa una disminución en la tasa de embarazo cuando alguno de los embriones transferidos está fragmentado en comparación a cuando ninguno lo está. (*)² Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, sí se observó una tendencia en cuanto a que a mayor tiempo entre desaparición de PN y primera división, menor embarazo.

CONCLUSIONES

1. Se produce un aumento de reabsorción y fragmentación cuando se dan alteraciones en la división, tanto en división anormal, como caótica. El tiempo transcurrido entre la desaparición de los PN y la primera división embrionaria, en la mayoría de los casos, también se alarga significativamente cuando hay alteraciones en la división, así como cuando hay reabsorción o fragmentación.
2. El factor masculino severo aumenta la reabsorción embrionaria. Sin embargo, no aumenta la fragmentación, las alteraciones durante la división embrionaria, ni alarga el tiempo entre desaparición de PN y primera división.
3. La reabsorción, considerada de forma aislada, no disminuyó la tasa de embarazo, sino que la aumentó. Las alteraciones en la división, tanto división anormal como caótica, disminuyeron de forma significativa el porcentaje de embarazo. Finalmente, los datos sugieren que el aumento en la fragmentación disminuyó el porcentaje de embarazo, pero no todas las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas. El tiempo entre desaparición de PN y primera división fue ligeramente mayor en embriones que dieron como resultado No Embarazo, pero la diferencia con respecto a los embriones que dieron como resultado Embarazo no fue estadísticamente significativa.
4. El tipo de división es el parámetro más influyente en la tasa de embarazo, y afecta a todos los demás parámetros (reabsorción, fragmentación, y tiempo entre desaparición de PN y primera división), por lo que podría ser usado como marcador a la hora de seleccionar los embriones de mejor calidad.

CONCLUSIONS

1. Reabsorption and fragmentation are increased when the embryo suffers some alterations in its division, both abnormal and chaotic division. The time between the disappearance of pronuclei (PN) and first division is also increased when there are alterations in the division of the embryo, reabsorption or/and fragmentation.
2. Severe male factor increases embryonic reabsorption. However, no increase in fragmentation, alterations in division or a longer time between disappearance of PN and first division has been observed.
3. Reabsorption, as an isolated factor, did not decrease the pregnancy rate. On the contrary, it increased pregnancy rate. Alterations in division, both abnormal and chaotic divisions, diminished drastically the pregnancy rate. Finally, data showed that when fragmentation increased, the pregnancy rate decreased, but not all the differences found were statistically significant. The time between the disappearance of PN and first division was slightly higher in embryos that resulted in No Pregnancy. Nevertheless, when this time was compared with that of embryos resulting in Pregnancy, the difference was not statistically significant.
4. Type of division is the parameter that most influences the pregnancy rate, and it affects all the parameters (reabsorption, fragmentation and time between the disappearance of PN and first division). Therefore, it could be used as a marker for a higher-quality-embryo selection.

BIBLIOGRAFÍA

1. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 2015, 3^o Edición.
2. Conaghan et al., 2013, Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial, *Fertility and Sterility*, vol 100, 412-419.
3. Wong et al., 2010, Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage, *Nature Biotechnology*, vol 28, 1115-1121.
4. Vera-Rodriguez, M., Chavez, S.L., Rubio, C., Pera, R.A., Simon, C., 2015, Prediction model for aneuploidy in early human embryo development revealed by single-cell analysis, *Nature Communications*, vol 6, n^o art. 7601.
5. Töihonen et al., 2015, Novel PRD-like homeodomain transcription factors and retrotransposon elements in early human development, *Nature communications*, vol 6, n^o art. 8207.
6. Dobson et al., 2004, The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development, *Human Molecular Genetics*, vol 13, 1461-1470.
7. Chavez et al., 2012, Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage, *Nature Communications*, vol 3, n^o art. 1251.
8. Basile, N., Morbeck, D., García-Velasco, J., Bronet, F., Meseguer, M., 2013, Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes, *Human Reproduction*, vol 28, 634-641.
9. Domínguez, F., Meseguer, M., Aparicio-Ruiz, B., Piqueras, P., Quiñonero, A., Simón, C., 2015, New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies, *Fertility and Sterility*, vol 104, 908-914.
10. Athayde et al., 2014, Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development, *Fertility and Sterility*, vol 101, 1637-1648.
11. Basile et al., 2014, Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis, *Fertility and Sterility*, vol 101, 699-704.
12. VerMilyea et al., 2014, Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multicentre study, *Reproductive BioMedicine Online*, vol 29, 729-736.
13. Sathananthan, H., 1998, Paternal Centrosomeal Dynamics in Early Human Development and Infertility, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol 15, 129-138.
14. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2010, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition.
15. Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., Ingerslev, H.J., 2012, Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment, *Human Reproduction*, vol 27, 1277-1285.

16. Armstrong, S., Vail, A., Mastenbroek, S., Jordan, V., Farquhar, C., 2015, Time-lapse in the IVF- lab: how should we assess potential benefit?, *Human Reproduction*, vol 30, 3-8.
17. Brison, D.R., Roberts, S.A., Kimber, S.J., 2013, How should we assess the safety of IVF technologies?, *Reproductive Medicine Online*, vol 27, 710-721.
18. De Novo Classification Request For Eeva™ System.
19. Chen, A.A., Tan, L., Suraj, V., Pera, R.R., Shen, S., 2013, Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application, *Fertility and Sterility*, vol 99, 1035-1043.